

(19) Japanese Patent Office (JP)

(12) Patent Publication (A)

(11) Publication number:

Tokkai 2001-17198

5 (P2001-17198A)

(43) Date of publication of application:

January 23, 2001 (2001.1.23)

(21) Application number: Tokuganhei 11-187924

10 (22) Date of filing: July 1, 1999 (1999.7.1)

(71) Applicant: 000003160

Toyo Boseki Kabushiki Kaisha

2-8, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi,

15 Osaka

(72) Inventor: Shizuo HATTORI

c/o Toyo Boseki Kabushiki Kaisha Tsuruga

Institute of Biotechnology, 10-24, Toyo-cho, Tsuruga-shi, Fukui

(72) Inventor: Yoshihisa KAWAMURA

20 c/o Toyo Boseki Kabushiki Kaisha Tsuruga

Institute of Biotechnology, 10-24, Toyo-cho, Tsuruga-shi, Fukui

(54) 【Title of the Invention】 Determination Method of  
Homocysteine and Reagent Composition for Measuring Homocysteine

25

(57) Abstract:

Problems to Be Solved: To provide a simple and accurate  
determination method of homocysteine.

Means of solving the Problems: A measurement method of

30 homocysteine, which comprises making transferase using  
homocysteine as one of substrates and another kind of substrate  
to act on a sample, and analyzing the compound produced by the  
transferase reaction without using a chromatography or an  
antigen-antibody reaction; and a reagent composition for  
35 determining homocysteine to be used in the determination method.

【What Is Claimed Is】

【Claim 1】 A determination method of homocysteine, which comprises reacting a sample with transferase using homocysteine as one of the substrates and a different kind of substrate of  
5 the enzyme, and analyzing a compound produced by the transferase reaction without using chromatography or antigen-antibody reaction.

【claim 2】 The determination method of homocysteine of claim 1, wherein the transferase using homocysteine as one of the  
10 substrates is betaine-homocysteine methyltransferase or homocysteine methyltransferase.

【claim 3】 The determination method of homocysteine of claim 2, wherein the transferase using homocysteine as one of the substrates is betaine-homocysteine methyltransferase.

15 【claim 4】 The determination method of homocysteine of any of claims 1-3, wherein the compound produced by the transferase reaction is methionine.

【claim 5】 The determination method of homocysteine of any of claims 1-3, wherein the compound produced by the transferase  
20 reaction is dimethylglycine.

【claim 6】 The determination method of homocysteine of claim 5, wherein the dimethylglycine produced by the transferase reaction is reacted with dimethylglycine oxidase and the product thereof is analyzed.

25 【claim 7】 The determination method of homocysteine of claim 5, wherein the produced dimethylglycine is reacted with dimethylglycine oxidase and sarcosine oxidase, and the product thereof is analyzed.

【claim 8】 A homocysteine measurement reagent composition  
30 comprising a betaine-homocysteine methyltransferase or homocysteine methyltransferase and a substrate of the transferase other than homocysteine.

【claim 9】 The reagent composition for homocysteine measurement according to claim 8, which comprises a reagent for methionine

measurement.

【claim 10】 The reagent composition for homocysteine measurement according to claim 8, which comprises a reagent for dimethylglycine measurement.

5 【claim 11】 The reagent composition for homocysteine measurement according to claim 8, which comprises dimethylglycine oxidase.

【Detailed Description of the Invention】

【0001】

10 【Technical Field to which the Invention pertains】

The present invention relates to a method for enzymatically measuring homocysteine and a reagent composition used therefor.

【0002】

15 【Prior Art】

Homocysteine is, a metabolic intermediate amino acid in the metabolism of a sulfur-containing amino acid methionine into cysteine in the body, and is generally present in the body at a low concentration. However, any abnormality in this  
20 metabolic pathway directly results in an increase in the homocysteine level and can be an indicator of various diseases, which has made it one of the clinically useful amino acids. Homocystinuria, for example, which is an innately abnormal metabolism, is an abnormality in amino acid metabolism derived  
25 from the deletion of cystathionine  $\beta$  synthetase or methyltetrahydrofolate methyltransferase. Recently, moreover, increase in blood homocysteine concentration has been found to relate to the onset of arteriosclerosis, where increased blood concentration is considered to be connected to a risk factor of  
30 heart disease or vessel disease. It has been also reported to be an indicator of diabetes, alcoholism, liver and renal diseases, neuronal disease and the like.

【0003】

As a method widely known as a determination method of

homocysteine, is chromatography. For example, homocysteine is reacted with adenosine in the presence of S-adenosylhomocysteine hydrolase, and the resulting product, S-adenosylmethionine, is separated by HPLC (Totani et al.,  
5 Biochem. Soc., 14(6), 11712 (1988) and Shimizu et al.,  
Biotchnol. Appl. Biochem., 8, 153 (1986)). Another method comprises reacting homocysteine with fluorescent for HPLC-fluorescent analysis (Refsum et al., Clin. Chem., 35(9), 1921 (1989)). Furthermore, a method has been reported wherein  
10 homocysteine is converted to methionine in the presence of N<sup>5</sup>-methyltetrahydrofolate by the action of N<sup>5</sup>-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase, which is reacted with fluorescent and subjected to HPLC-fluorescent analysis (Garras et al., Anal. Biochem., 199, 112 (1991)).

15 [0004]

Japanese Patent Application under PCT laid-open under kohyo No. 8-506478 describes a method for non-chromatography quantitative determination using S-adenosylhomocysteine hydrolase. According to this method, homocysteine is reacted  
20 with adenosine, fluorescein-labeled S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase, and S-adenosylhomocysteine present in the reaction mixture is trapped using anti-S-adenosylhomocysteine antibody and subjected to fluorescence polarization immunoassay. This publication describes in detail  
25 a method utilizing S-adenosylhomocysteine hydrolase.

[0005]

WO98/07872 describes a method comprising reacting homocysteine with homocysteine desulfurase and using the produced ammonia,  $\alpha$ -ketobutylic acid or hydrogen sulfide for  
30 determination.

[0006]

[Problems to be Solved by the Invention]

As mentioned above, there are various reports on the method for determining homocysteine, but none of them is

satisfactory. A determination method utilizing chromatography generally requires a sophisticated apparatus. It also requires burdensome costs and longer time. An immunoassay method is known to be complicated and take longer time as compared to  
5 general biochemical reactions. In addition, homocysteine desulfurase acts on cysteine, O-acetylserine and methionine besides homocysteine, and accurate quantitative determination of homocysteine is difficult.

【0007】

10 【Means of Solving the Problems】

In view of the above-mentioned situation, the present inventors have conducted intensive studies and found that homocysteine can be accurately determined by reacting transferase using homocysteine as one of the substrates with a  
15 different kind of the substrates of the enzyme and analyzing the compound produced by this enzyme reaction without chromatography or antigen-antibody reaction, which resulted in the completion of the present invention.

【0008】

20 Accordingly, the present invention has the following constitution.

(1) A determination method of homocysteine, which comprises reacting a sample with transferase using homocysteine as one of the substrates and a different kind of substrate of the enzyme,  
25 and analyzing a compound produced by the transferase reaction without using chromatography or antigen-antibody reaction.

(2) The determination method of homocysteine of (1), wherein the transferase using homocysteine as one of the substrates is betaine-homocysteine methyltransferase or homocysteine  
30 methyltransferase.

(3) The determination method of homocysteine of (2), wherein the transferase using homocysteine as one of the substrates is betaine-homocysteine methyltransferase.

(4) The determination method of homocysteine of any of (1) to

(3), wherein the compound produced by the transferase reaction is methionine.

(5) The determination method of homocysteine of any of (1) to (3), wherein the compound produced by the transferase reaction  
5 is dimethylglycine.

(6) The determination method of homocysteine of (5), wherein the dimethylglycine produced by the transferase reaction is reacted with dimethylglycine oxidase and the product thereof is analyzed.

10 (7) The determination method of homocysteine of (5), wherein the produced dimethylglycine is reacted with dimethylglycine oxidase and sarcosine oxidase, and the product thereof is analyzed.

(8) A homocysteine measurement reagent composition comprising a  
15 betaine-homocysteine methyltransferase or homocysteine methyltransferase and a substrate of the transferase other than homocysteine.

(9) The reagent composition for homocysteine measurement according to (8), which comprises a reagent for methionine  
20 measurement.

(10) The reagent composition for homocysteine measurement according to (8), which comprises a reagent for dimethylglycine measurement.

(11) The reagent composition for homocysteine measurement  
25 according to (8), which comprises dimethylglycine oxidase.

【0009】

【Embodiment of the Invention】

The determination method of homocysteine of the present invention is characterized in that a sample is reacted with  
30 transferase using homocysteine as one of the substrates and a different kind of the substrates of the enzyme and the compound produced by this enzyme reaction is analyzed without using chromatography or antigen-antibody reaction.

【0010】

Examples of the transferase using homocysteine as one of the substrates used in the present invention include betaine-homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.5), homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.10) and N<sup>5</sup>-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.13). Preferably, it is betaine-homocysteine methyltransferase.

【0011】

The betaine-homocysteine methyltransferase is an enzyme that catalyzes the following reaction.

10        betaine+L-homocysteine → dimethylglycine+L-methionine

【0012】

The betaine-homocysteine methyltransferase can be harvested from mammal and *Pseudomonas* bacteria, and may be produced by a gene recombinant microorganism obtained by incorporating these genes in a different microorganism and the like. It also includes one genetically modified. When betaine-homocysteine methyltransferase is used, betaine is used as another substrate, which is commercially available in the form of a hydrochloride at a low cost. Dimethylglycine and methionine that are the produced by the above-mentioned enzyme reaction can be determined by the following method.

【0013】

Dimethylglycine is decomposed by dimethylglycine oxidase (EC 1.5.3.10) into sarcosine, formaldehyde and hydrogen peroxide. The process of the decomposition can be determined using oxygen consumption, hydrogen peroxide sensor, or directly or in the presence of peroxidase using a redox indicator. The produced formaldehyde can be measured for UV region or visible region using Hanz reagent and NAD<sup>+</sup> dependent formaldehyde dehydrogenase. Moreover, addition of sarcosine oxidase (EC 1.5.3.1) causes decomposition into glycine, formaldehyde and hydrogen peroxide, and enables more sensitive determination. Furthermore, enhanced sensitivity can be achieved using formaldehyde oxidase. Dimethylglycine oxidase can be obtained

from mammal, *Cylindrocarpon*, *Achromobacter* bacteria, and formaldehyde oxidase can be obtained from *Cylindrocarpon* and the like. Those produced by gene recombinant microorganism incorporating these genes or genetically modified ones can be also used. In addition, genetically modified ones can be also used. Sarcosine oxidase, formaldehyde dehydrogenase are commercially available. Dimethylglycine dehydrogenase (EC 1.5.99.2) decomposes dimethylglycine into sarcosine, formaldehyde in the presence of an electron receptor. The process thereof can be determined using a redox indicator or by the measuring formaldehyde. The use of sarcosine dehydrogenase (EC 1.5.99.1) multiplies the sensitivity. Dimethylglycine dehydrogenase can be obtained from higher animals and sarcosine dehydrogenase can be obtained from *Pseudomonas*. Those produced by gene recombinant microorganism incorporating these genes or genetically modified ones can be also used.

【0014】

On the other hand, methionine is decomposed into the corresponding keto acid, ammonia and hydrogen peroxide by methionine racemase and D-amino acid oxidase. Ammonia can be determined by, for example, a known colorimetric quantitative determination technique such as indophenol method, and hydrogen peroxide can be determined by the aforementioned method. Methionine racemase can be harvested from *Pseudomonas*, *Streptococcus* bacteria and D-amino acid oxidase is commercially available.

【0015】

Homocysteine methyltransferase is an enzyme that catalyzes the following reaction.

L-homocysteine+S-adenosylmethionine → L-methionine+S-adenosylhomocysteine 【0016】

Homocysteine methyltransferase can be harvested from mammal, plant, yeast (*Saccharomyces*). Those produced by gene recombinant microorganism incorporating these genes and the



like can be used. It also includes genetically modified ones. When homocysteine methyltransferase is used, S-adenosylmethionine is used as the different substrate, which is commercially available. The methionine produced by the above-mentioned enzyme reaction can be determined by the above-mentioned method.

5      [0017]

          N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase is an enzyme that catalyzes the following reaction

10        L-homocysteine+N<sup>5</sup>-methyltetrahydrofolate → L-methionine+tetrahydrofolate

          [0018]

          N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase can be harvested from mammal, *Escherichia coli*. Those produced by gene recombinant microorganism incorporating these genes and the like can be used. It also includes genetically modified ones. When this enzyme is used, N<sup>5</sup>-methyltetrahydrofolate is used as the different substrate, which is commercially available. The methionine produced by the above-mentioned enzyme reaction can be determined by the above-mentioned method, and tetrahydrofolate can be measured for UV region or visible region by NADP<sup>+</sup> dependent tetrahydrofolate dehydrogenase. N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase can be obtained from higher animals and plant.

25      [0019]

          When the sample to be measured is a biological sample, particularly, plasma or urine, homocysteine is present as free homocysteine, but mostly present as a disulfide bond conjugate with a circulating protein such as albumin or with a thiol compound such as cysteine, due to the disulfide bond. When the measurement target is total homocysteine, it is necessary to pre-treat a sample with a reducing agent to convert the conjugated homocysteine to free homocysteine.

          [0020]

As the reducing agent to be used in this case, thiols, borohydrides, amalgams, phosphine, phosphothioate and the like can be exemplified. Examples of thiols include dithiothreitol, dithioerythritol, 2-mercaptoethanol, 2-mercaptomethylamine, cysteine, cystamine, cysteine thioglycorate, thioglycolic acid, reduced glutathione and the like, examples of borohydrides include sodium borohydride and the like, and examples of amalgams include sodium amalgam and the like.

【0021】

10 In the determination method of homocysteine of the present invention, transferase using homocysteine as one of the substrates is preferably used in the presence of a reducing agent which is a pre-treatment solution, or a sample is treated with a reducing agent before using the enzyme. Because in most  
15 of the former cases, transferase is instable at a low pH at which a reducing agent is stable, such as pH 3, they are preferably preserved in two separate reagent solutions immediately before use. In this case, the reducing agent is preserved in an acidic pH solution having low buffering ability,  
20 and transferase is preserved in a neutral solution having sufficient buffering ability, and mixed for use when treating a sample. It is desirable to use a transferase which can be preserved and used at an acidic pH where a reducing agent is stable.

25 【0022】

A determination reagent for a compound produced by reacting transferase using homocysteine as one of the substrates is preferably preserved with the transferase, as necessary, or preserved separately. When the determination  
30 reagent is based on oxygen consumption, hydrogen peroxide sensor, or determination (of absorbance) in UV region in dehydrogenase reaction, it is generally usable along with a reducing agent. When a determination reagent is used for direct determination or determination in the presence of

peroxidase, determination using a redox indicator, or determination (of absorbance) in visible region in dehydrogenase (reaction), it is used separately from a reducing agent.

5    【0023】

As a buffer used for a reagent solution containing transferase using homocysteine as one of the substrates or for a determination reagent of the product by the transferase reaction, Tris-HCl buffer, phosphate buffer, borate buffer, 10 GOOD buffer and the like are mentioned. The Tris-HCl buffer and phosphate buffer tend to vary (their pH) depending on concentration and temperature, but advantageously economical. As GOOD buffer, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, BES, MOPS, TES, HEPES, Tricine, Bicine, POPSO, TAPS, CHES, CAPS and the like 15 are mentioned. These are expensive but particularly useful for liquid diagnostics. These buffers preferably have a pH adjusted within the range of 5.0-9.0 according to the object of use.

      【0024】

20       As a stabilizer of an enzyme contained in the above-mentioned reagent solution, a metal salt, a protein, amino acid, saccharide, an organic acid, a surfactant and the like can be used. The protein is desirably one free of influence on the enzyme activity and is exemplified by bovine serum albumin 25 (BSA), ovalbumin, gelatin and the like. As the amino acid, lysine, histidine, glutamic acid and the like, which are generally used, and glycylglycine, polylysine and the like can be used, with preference given to one having a high water-solubility. As the saccharide, any such as monosaccharide, 30 disaccharide, oligosaccharide and polysaccharide can be used. The derivatives thereof can be also used. To be specific, glucose, fructose, galactose, mannose, xylose, sucrose, lactose, maltose, trehalose, maltotriose, maltosylcyclodextrin,  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin,  $\gamma$ -cyclodextrin, dextrin, amylose,

glycogen, starch, inulin, glucosamine, inositol, mannitol, sorbitol, ribitol and deoxyglucose and the like are mentioned. As the organic acid,  $\alpha$ -keto-glutaric acid, malic acid, fumaric acid, gluconic acid, cholic acid, desoxycholic acid and the like are mentioned. As the surfactant, nonionic ones are preferable. In addition, boric acid, borax, potassium chloride, sodium chloride, ammonium sulfate, glycerol, Ficoll, EDTA and EGTA can be used.

#### 【0025】

10 A solution used for a reagent solution containing transferase using homocysteine as one of the substrates or for a determination reagent of the product by the transferase reaction, may contain antiseptic, surfactant and the like to the extent the capability of the reagent is not particularly  
15 damaged. As the antiseptic, sodium azide, chelating agent, antibiotic, antibacterial agent, antifungal agent and the like are mentioned. As the surfactant, non-ionic surfactant, cationic surfactant, anionic surfactant, amphoteric surfactant and the like are mentioned, with preference given to Triton X-  
20 100, CHAPS, potassium cholate and the like.

#### 【0026】

#### 【Examples】

The present invention is explained in detail in the following by referring to Examples.

#### 25 【0027】

#### **Example 1** Preparation of dimethylglycine oxidase

The activity of dimethylglycine oxidase was determined according to the following determination method.

<reagent> 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 mM  
30 dimethylglycine, 0.5 mM 4-aminoantipyrine, 2 mM phenol, 0.05% Triton X-100, 5 U/ml peroxidase (Toyo Boseki Kabushiki Kaisha)

#### 【0028】

<measurement conditions>

After preincubation of the above-mentioned determination

mixture (3 ml) at 37°C for about 5 min, 0.1 ml of enzyme solution is admixed, which is followed by recording (absorbance) for 5 minutes with a spectrophotometer controlled to 37°C using water as a control. The changes in absorbance at 500 nm per minute are determined from the linear part of the record. As a blind trial, distilled water is added to the reagent mixture instead of the enzyme solution and changes in absorbance are measured in the same manner. The amount of an enzyme that produces 1  $\mu$ mole of hydrogen peroxide per 1 min under the above-mentioned conditions is taken as 1 unit (U).

#### [0029]

A medium (pH 7.0, 60 ml) containing dimethylglycine (3%), polypeptone (1.6%), yeast extract (0.2%), dihydrogenpotassium phosphate (0.55%), hydrogendipotassium phosphate (1.4%) and magnesium sulfate (0.1%) was placed in a 500 ml Sakaguchi flask and treated in an autoclave at 121°C for 15 min. As a seed, one platinum loop of *Arthrobacter globiformis* IF012137 was inoculated, cultured at 30°C for 24 hr and used as a seed culture. The medium (6 L) was transferred to a 10 L jar fermentor and treated in an autoclave at 121°C for 15 min. After cooling, the seed culture (60 ml) was transferred and cultured at 600 rpm, aeration 2 L/min, 30°C for 48 hr. The culture was subjected to centrifugal separation to collect the cells, which were suspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). The suspension was treated with French Press, and subjected to centrifugal separation to give a supernatant (enzyme solution). The obtained enzyme solution was subjected to sulfate fractionation, DEAE-sepharose chromatography, phenylsepharose chromatography and gel filtration by sephadex G-200 to allow purification to the specific activity of 12 U/mg.

#### [0030]

#### **Example 2** Preparation of betaine-homocysteine methyltransferase

The activity of betaine-homocysteine methyltransferase was determined according to the following determination method.

<reagent>

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 mM betaine, 20 mM L-homocysteine, 0.5 mM 4-aminoantipyrine, 2 mM phenol, 0.05% Triton X-100, 10 U/ml dimethylglycine oxidase, 5 U/ml

5 peroxidase (Toyo Boseki Kabushiki Kaisha)

【0031】

<measurement conditions>

After preincubation of the above-mentioned determination mixture (3 ml) at 37°C for about 5 min, 0.1 ml of enzyme  
10 solution is admixed. After admixing gently, recording (absorbance) for 5 minutes with a spectrophotometer controlled to 37°C was done using water as a control. The changes in absorbance at 500 nm per minute are determined from the linear part of the record. As a blind trial, distilled water is added  
15 to the reagent mixture instead of the enzyme solution and changes in absorbance are measured in the same manner. The amount of an enzyme that produces 1  $\mu$ mole of hydrogen peroxide per 1 min under the above-mentioned conditions is taken as 1 unit (U).

20 【0032】

Swine liver was homogenized in an ice-cooled 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 0.1 M NaCl, and subjected to centrifugal separation and ultra-centrifugal separation to give a supernatant (enzyme solution). The obtained enzyme was  
25 subjected to sulfate fractionation and DEAE-sepharose chromatography to allow purification to the specific activity of 1 U/mg.

【0033】

**Example 3** Determination of homocysteine standard sample

30 A homocysteine standard solution (50  $\mu$ l) was mixed with a solution (2.0 ml) containing 1 U/ml betaine-homocysteine methyltransferase, 10 U/ml dimethylglycine oxidase, 5 U/ml peroxidase, 40 mM betaine, 0.5 mM 4-aminoantipyrine, 2 mM phenol, 0.05% Triton X-100 and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)

and reacted at 37°C for 10 minutes. The absorbance at 500 nm was measured with a spectrophotometer. The results are as shown in Fig. 1, wherein superior linearity was shown in the range of homocysteine amount of 0 - 0.5 micromole, affording  
5 quantitative determination.

【0034】

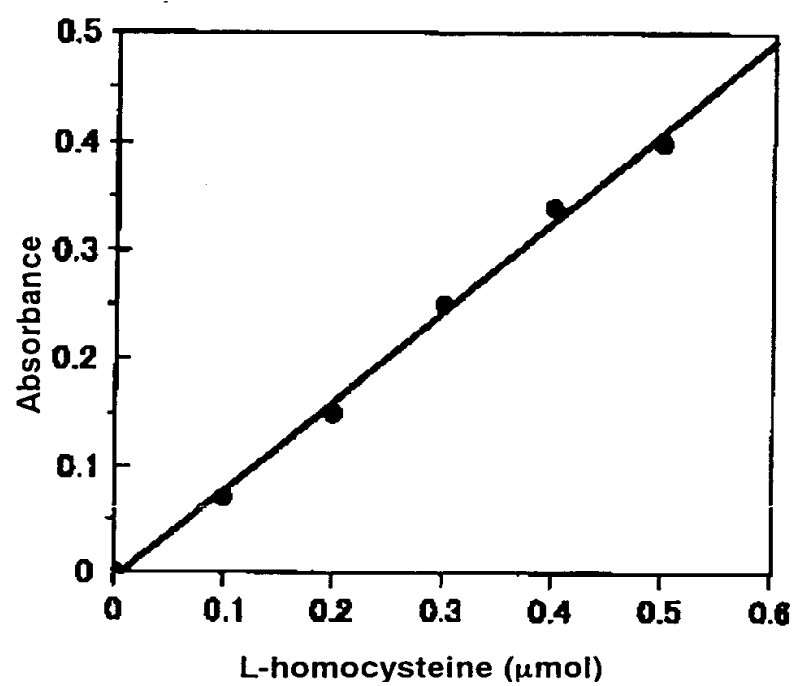
【Effect of the Invention】

As mentioned above, by the determination method of homocysteine of the present invention, high sensitive  
10 quantitative determination of homocysteine has been enabled, as compared to conventional methods comprising use of chromatography and antigen-antibody reaction for the quantitative determination of homocysteine. In particular, quantitative determination of homocysteine in serum as a risk  
15 factor of heart diseases has been drawing attention. The high sensitive determination method of homocysteine of the present invention is expected to be used widely as an economical and convenient method.

【Brief Description of Drawing】

20 Fig. 1 shows quantitative determination property of the determination method of homocysteine according to the present invention.

[Fig. 1]





(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-17198

(P2001-17198A)

(43) 公開日 平成13年1月23日 (2001.1.23)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード (参考)
C 1 2 Q 1/48		C 1 2 Q 1/48	Z 2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/68		G 0 1 N 33/68	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平11-187924	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成11年7月1日 (1999.7.1)	(72) 発明者	服部 静夫 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	川村 良久 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		Fターム (参考)	2G045 AA13 AA16 CA25 CB03 DA35 FB01 FB03 FB06 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ80 QR03 QR06 QX01

(54) 【発明の名称】 ホモシステインの測定方法およびホモシステイン測定用試薬組成物

## (57) 【要約】

【課題】 簡便で、正確な定量が可能なホモシステインの測定方法を提供する。

【解決手段】 試料に、ホモシステインを基質の一つとする転移酵素、および該酵素のもう一種類の基質を作用させ、該転移酵素反応により生成した化合物を、クロマトグラフィーもしくは抗原抗体反応を用いることなく分析することを特徴とするホモシステインの測定方法および該測定方法に用いられるホモシステイン測定用試薬組成物。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料に、ホモシステインを基質の一つとする転移酵素、および該酵素のもう一種類の基質を作用させ、該転移酵素反応により生成した化合物を、クロマトグラフィーもしくは抗原抗体反応を用いることなく分析することを特徴とするホモシステインの測定方法。

【請求項2】 ホモシステインを基質の一つとする転移酵素がベタイン-ホモシステインメチル転移酵素もしくはホモシステインメチル転移酵素である請求項1記載のホモシステインの測定方法。

【請求項3】 ホモシステインを基質の一つとする転移酵素がベタイン-ホモシステインメチル転移酵素である請求項2記載のホモシステインの測定方法。

【請求項4】 転移酵素反応により生成される化合物がメチオニンである請求項1～3のいずれかに記載のホモシステインの測定方法。

【請求項5】 転移酵素反応により生成される化合物がジメチルグリシンである請求項1～3のいずれかに記載のホモシステインの測定方法。

【請求項6】 転移酵素反応により生成されるジメチルグリシンにジメチルグリシンオキシダーゼを作用させ、その生成物を分析する請求項5記載のホモシステインの測定方法。

【請求項7】 生成したジメチルグリシンにジメチルグリシンオキシダーゼおよびサルコシンオキシダーゼを作用させ、その生成物を分析する請求項5記載のホモシステインの測定方法。

【請求項8】 ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素もしくはホモシステインメチル転移酵素およびホモシステイン以外の該転移酵素の基質を含有してなることを特徴とするホモシステイン測定試薬組成物。

【請求項9】 メチオニン測定用試薬を含有する請求項8記載のホモシステイン測定試薬組成物。

【請求項10】 ジメチルグリシン測定用試薬を含有する請求項8記載のホモシステイン測定試薬組成物。

【請求項11】 ジメチルグリシンオキシダーゼを含有する請求項8記載のホモシステイン測定試薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ホモシステインの酵素的測定法およびそれに用いられる試薬組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ホモシステインは生体内では含硫黄アミノ酸、メチオニンからシステインへの代謝における代謝中間アミノ酸であり、通常低濃度で生体内に存在する。しかしながらこの代謝経路の異常はホモシステインレベルの上昇に直結し、各種疾患のインディケーターと成り得ることより臨床的に有用なアミノ酸の一つとされている。例えば、先天性代謝異常であるホモシチン尿症に

おいてはシスタチオニンβシンセターゼまたはメチルテトラヒドロ葉酸メチル転移酵素に欠失があることに由来するアミノ酸代謝異常である。また最近、血中ホモシステイン濃度の上昇がアテローム性動脈硬化症の発症に関連づけられるようになり、血中濃度の上昇が心臓疾患または脈管疾患の危険因子と結びつくものと考えられている。また糖尿病やアルコール中毒、肝および腎疾患や神経疾患等のインディケーターとしても報告されている。

【0003】ホモシステインの測定方法として広く知られた方法としては、クロマトグラフィーが挙げられる。例えば、ホモシステインをS-アデノシルホモシステイン加水分解酵素の存在下、アデノシンと反応させた後、生成物であるS-アデノシルメチオニンをHPLCで分離する方法がある(Totani et al., Biochem. Soc., 14(6), 11712(1988)およびShimizu et al., Biotechnol. Appl. Biochem., 8, 153(1986))。また、ホモシステインを蛍光団と反応させ、HPLC-蛍光分析する方法もある(Refsum et al., Clin. Chem., 35(9), 1921(1989))。さらには、ホモシステインをN5-メチルテトラヒドロ葉酸存在下、N5-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインメチル転移酵素の作用によりメチオニンに変換した後、蛍光団と反応させ、HPLC、蛍光分析する方法も報告されている(Garras et al., Anal. Biochem., 199, 112(1991))。

【0004】特表平8-506478号公報には、S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素を用いた非クロマトグラフィー定量法が記載されている。この方法においては、ホモシステインを、アデノシン、フルオレセイン標識S-アデノシルホモシステイン、S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素と反応後、反応液に存在するS-アデノシルホモシステインを抗S-アデノシルホモシステイン抗体で捕捉し、蛍光偏光免疫アッセイを行う方法を中心に、S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素を利用する方法が詳述されている。

【0005】国際公開公報WO98/07872には、ホモシステインをホモシステインデスルファラーゼに作用させ、生成するアンモニア、α-ケト酪酸または硫化水素を測定に用いる方法が記載されている。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】上述したように、ホモシステインを測定する方法としては種々報告されているものの、いずれも満足なものではない。クロマトグラフィーを利用する測定方法は一般的に精巧な装置を必要とする。また費用的、時間的に負担が大きい方法である。また、免疫アッセイ法も一般生化学反応に比較すると複雑で時間がかかることが知られている。また、ホモシステインデスルファラーゼはホモシステイン以外にシステイン、O-アセチルセリン、メチオニンにも作用するので、正確なホモシステインの定量が困難である。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意検討した結果、ホモシステインを基質の一つとする転移酵素、および該酵素のもう1種類の基質を作用させ、該酵素反応により生成した化合物を、クロマトグラフィーや抗原抗体反応を用いることなく分析することによりホモシステインの正確な測定が実現できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0008】すなわち、以下のような構成から成る。

(1) 試料に、ホモシステインを基質の一つとする転移酵素、および該酵素のもう一種の基質を作用させ、該転移酵素反応により生成した化合物を、クロマトグラフィーもしくは抗原抗体反応を用いることなく分析することの特徴とするホモシステインの測定方法。

(2) ホモシステインを基質の一つとする転移酵素がベタインーホモシステインメチル転移酵素もしくはホモシステインメチル転移酵素である(1)のホモシステインの測定方法。

(3) ホモシステインを基質の一つとする転移酵素がベタインーホモシステインメチル転移酵素である(2)のホモシステインの測定方法。

(4) 転移酵素反応により生成される化合物がメチオニンである(1)～(3)のいずれかのホモシステインの測定方法。

(5) 転移酵素反応により生成される化合物がジメチルグリシンである(1)～(3)のいずれかのホモシステインの測定方法。

(6) 転移酵素反応により生成されるジメチルグリシンにジメチルグリシンオキシダーゼを作用させ、その生成物を分析する(5)のホモシステインの測定方法。

(7) 生成したジメチルグリシンにジメチルグリシンオキシダーゼおよびサルコシンオキシダーゼを作用させ、その生成物を分析する(5)のホモシステインの測定方法。

(8) ベタインーホモシステインメチル転移酵素もしくはホモシステインメチル転移酵素およびホモシステイン以外の該転移酵素の基質を含有してなることを特徴とするホモシステイン測定試薬組成物。

(9) メチオニン測定用試薬を含有する(8)のホモシステイン測定試薬組成物。

(10) ジメチルグリシン測定用試薬を含有する(8)のホモシステイン測定試薬組成物。

(11) ジメチルグリシンオキシダーゼを含有する

(8)のホモシステイン測定試薬組成物。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明のホモシステインの測定方法は、試料に、ホモシステインを基質の一つとする転移酵素、および該酵素のもう一つの基質を作用させ、該酵素反応により生成した化合物を、クロマトグラフィーや抗原抗体反応を用いることなく分析することの特徴とするである。

【0010】本発明において使用されるホモシステインを基質の一つとする転移酵素の例として、ベタインーホモシステインメチル転移酵素(EC 2. 1. 1. 5)、ホモシステインメチル転移酵素(EC 2. 1. 1. 10)およびN<sup>5</sup>-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインメチル転移酵素(EC 2. 1. 1. 13)を挙げることができる。好ましくは、ベタインーホモシステインメチル転移酵素である。

【0011】ベタインーホモシステインメチル転移酵素は、下記の反応を触媒する酵素である。ベタイン+L-ホモシステイン→ジメチルグリシン+L-メチオニン

【0012】ベタインーホモシステインメチル転移酵素は哺乳動物、シュードモナス(Pseudomonas)属細菌から採取することが可能であり、これらの遺伝子を他の微生物に組み込ませた遺伝子組換え微生物により製造されたものなどであってもよい。また、遺伝的に性質を改変したものも含有する。またベタインーホモシステインメチル転移酵素を用いる場合、もう一つの基質としてベタインが使用されるが、これは塩酸塩の形で安価に市販されている。上記酵素反応による生成物であるジメチルグリシンとメチオニンは以下の方法で測定できる。

【0013】ジメチルグリシンはジメチルグリシンオキシダーゼ(EC 1. 5. 3. 10)により、サルコシン、ホルムアルデヒド、過酸化水素に分解されるが、その過程を酵素消費、過酸化水素センサー、または直接およびベルオキシダーゼ存在下、酸化還元指示薬を用いての測定が可能である。生成したホルムアルデヒドはHantz試薬、NAD<sup>+</sup>依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素により紫外測定または可視部測定が可能である。更に、サルコシンオキシダーゼ(EC 1. 5. 3. 1)を追加して加えると、グリシン、ホルムアルデヒド、過酸化水素に分解され、感度的に倍加して測定できる。また更に、ホルムアルデヒドオキシダーゼで感度のより向上が可能である。ジメチルグリシンオキシダーゼは哺乳動物、シリンドロカーボン(Cylindrocarchon)属、アクロモバクター(Achromobacter)属細菌より、ホルムアルデヒドオキシダーゼはシリンドロカーボン(Cylindrocarchon)属等より取得できるが、これらを他の微生物に組み込ませた遺伝子組換え微生物より製造されたものや、また遺伝的に性質を改変したものでも良い。また遺伝的に性質を改変したものでも良い。サルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒド脱水素酵素は市販のものが入手できる。またジメチルグリシン脱水素酵素(EC 1. 5. 99. 2)は電子受容体存在下、ジメチルグリシンをサルコシン、ホルムアルデヒドに分解するが、その過程を酸化還元指示薬を用いて、またはホルムアルデヒドを測定することで測定が可能である。サルコシン脱水素酵素(EC 1. 5. 99. 1)の使用は感度を倍加させる。ジメチルグリシン脱水素酵素は高等動物より、サルコシン脱水素酵素はシュードモナス(Pseudomo

nas) 属より取得できるが、これらの遺伝子を他の微生物に組み込ませた遺伝子組換え微生物より製造されたものや、また遺伝的に性質を改変したものでも良い。

【0014】一方、メチオニンはメチオニンラセマーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼで対応するケト酸、アンモニア、過酸化水素に分解される。アンモニアは、例えばインドフェノール法のような公知の比色定量技術により、また過酸化水素は上述の方法により測定が可能である。メチオニンラセマーゼはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属細菌より採取が可能であり、D-アミノ酸オキシダーゼは市販されている。

【0015】ホモシステインメチル転移酵素は、下記の反応を触媒する酵素である。

L-ホモシステイン + S-アデノシルメチオニン → L-メチオニン + S-アデノシルホモシステイン

【0016】ホモシステインメチル転移酵素は哺乳動物、植物、酵母 (*Saccharomyces*) からの採取が可能であり、これらの遺伝子を他の微生物に組み込まれた遺伝子組換え微生物より製造されたものなどであってもよい。また、遺伝的に性質を改変したものも含有する。またホモシステインメチル転移酵素を用いる場合、もう一つの基質としてS-アデノシルメチオニンが使用されるが、これは市販品が入手可能である。上記酵素反応における生成物のメチオニンは上述の方法で測定できる。

【0017】また、N<sup>5</sup>-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインメチル転移酵素は、下記の反応を触媒する酵素である。L-ホモシステイン + N<sup>5</sup>-メチルテトラヒドロ葉酸 → L-メチオニン + テトラヒドロ葉酸

【0018】N<sup>5</sup>-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインメチル転移酵素は哺乳動物、大腸菌からの採取が可能であり、これらの遺伝子を他の微生物に組み込まれた遺伝子組換え微生物より製造されたものなどであってもよい。また、遺伝的に性質を改変したものも含有する。また本酵素を用いる場合、もう一つの基質としてN<sup>5</sup>-メチルテトラヒドロ葉酸が使用されるが、これは市販品が入手可能である。生成物のメチオニンは上述の方法で測定でき、テトラヒドロ葉酸はNADP<sup>+</sup>依存性テトラヒドロ葉酸脱水素酵素により紫外部測定または可視部測定が可能である。なお、N<sup>5</sup>-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインメチル転移酵素は高等動物、植物より採取できる。

【0019】測定される試料が生体試料、特に血漿や尿の場合、遊離のホモシステインとしても存在するが、大部分はジスルフィド結合によりアルブミンのような循環タンパク質やシステインのようなチオール化合物とジスルフィド結合体となって存在している。また、測定対象が総ホモシステインの場合、試料を還元剤で前処理し、遊離ホモシステインに変換することが必要となる。

【0020】この場合に用いられる還元剤としては、チ

オール類、水素化ホウ素類、アマルガム、ホスフィンやホスホチオエート等を例示することができる。チオール類としては、具体的には、ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、2-メルカプトエタノール、2-メルカプトメチルアミン、システイン、シスタミン、システインチオグリコレート、チオグリコール酸、還元型グルタチオン等、水素化ホウ素類としては水素化ホウ素ナトリウム等、アマルガムとしてはナトリウムアマルガム等を挙げることができる。

【0021】本発明におけるホモシステインの測定方法においては、ホモシステインを基質の一つとして使用する転移酵素を前処理液である還元剤存在下に使用するか、または酵素を使用する以前に還元剤で処理する方法が好ましい。前者の多くの場合、転移酵素は還元剤が安定である低いpH、例えばpH3では不安定なので、使用直前まで二つの試液に分けて保存することがより好ましい。その場合、還元剤は低干渉能の酸性pH溶液に保存し、転移酵素は十分な緩衝能を有する中性溶液に保存し、試料処理時に混合して使用する。もちろん還元剤が安定な酸性pHで保存、使用できる転移酵素を使用することが望ましい。

【0022】ホモシステインを基質の一つとして使用する転移酵素を作用させることにより生成される化合物の測定試薬は必要に応じて、該転移酵素と共に保存するか、分離して保存するのが好ましい。測定試薬が酸素消費、過酸化水素センサー、または脱水素酵素反応の紫外部測定に基づくものであれば、一般的に還元剤と同時に使用可能であるが、測定試薬が直接およびベルオキシダーゼ存在下、酸化還元指示薬を用いての測定、脱水素酵素による可視部測定の場合には還元剤と分離して使用する。

【0023】ホモシステインを基質の一つとして使用する転移酵素を含む試液やその生成物の測定試薬に用いられる緩衝液としては、トリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、GOOD緩衝液などが挙げられる。トリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液は濃度、温度によって変動しやすいが、安価という利点がある。一方、GOOD緩衝液としてはMES、Bis-Tris、ADP、PIPES、ACES、BES、MOPS、TEA、HEPES、Tricine、Bicine、POPSO、TAPS、CHES、CAPSなどが例示される。これらは高価であるが、液状診断薬には特に有用である。これらの緩衝液のpHは好ましくは5.0~9.0の範囲で使用目的に応じて調整される。

【0024】上記試液に含まれる酵素の安定化剤として金属塩、蛋白質、アミノ酸、糖、有機酸、界面活性剤等を使用することができる。蛋白質としては酵素活性に影響を与えないものが望ましいが、ウシ血清アルブミン(BSA)、卵アルブミン、ゼラチン等を挙げることができる。アミノ酸としては、リジン、ヒスチジン、グル

タミン酸等一般的なものの以外、グリシルグリシンやポリリジン等が用いることができるが、水溶性の高いものが望ましい。糖としては、単糖、二糖、オリゴ糖や多糖を問わず用いることができる。また、これらの誘導体も用いることが可能である。具体的には、グルコース、フラクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、シュクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、マルトトリオース、マルトシルサイクロデキストリン、 $\alpha$ -サイクロデキストリン、 $\beta$ -サイクロデキストリン、 $\gamma$ -サイクロデキストリン、デキストリン、アミロース、グリコーゲン、デンプン、イヌリン、グルコサミン、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、リビトールおよびデオキシグルコース等を挙げることができる。有機酸としては、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、フマル酸、グルコン酸、コール酸やデオキシコール酸等が挙げられる。界面活性剤としては非イオン性のものが好ましい。その他、ホウ酸、ホウ砂、塩化カリウム、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、グリセロール、フィコール、EDTA、EGTAが使用可能である。

【0025】ホモシステインを基質の一つとして使用する転移酵素を含む試液やその生成物の測定試薬に用いられる溶液には、さらに防腐剤、界面活性剤などを試薬の性能に特に悪い影響を及ぼさない範囲で添加してもよい。防腐剤としてはアジ化ナトリウム、キレート剤、抗生物質、防菌剤、防黴剤などが挙げられる。界面活性剤としては非イオン性界面活性剤、陽イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤、両性イオン界面活性剤などが挙げられ、トリトンX-100、CHAPS、コール酸カリウムなどが好ましい。

【0026】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0027】

実施例1 ジメチルグリシンオキシダーゼの取得

ジメチルグリシンオキシダーゼの活性測定は、以下の測定方法により行った。

〈試薬〉

50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、100mM ジメチルグリシン、0.5mM 4-アミノアンチピリン、2mM フェノール、0.05%トリトンX-100、5U/ml ペルオキシダーゼ (東洋紡績製)

【0028】〈測定条件〉上記測定混液3mlを37℃で約5分間予備加温後、0.1mlの酵素溶液を加え、緩やかに混和後、水を対照に37℃に制御された分光光度計で5分間記録し、その直線部分から1分間あたりの500nmにおける吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に、吸光度変化を測定する。上記条件で1分間に1マイ

クロモルの過酸化水素を生成する酵素量を1単位 (U) とする。

【0029】ジメチルグリシン3%、ポリペプトン1.6%、酵母エキス0.2%、リン酸一カリ0.55%、リン酸水素二カリウム1.4%、硫酸マグネシウム0.1%を含む培地 (pH 7.0) 60mlを500ml容坂口フラスコに移し、121℃、15分間オートクレーブ処理を行った。種菌として、アルスロバクター・グロビフォルミス (Arthrobacter globiformis) IFO 12137株を一白金耳植菌し、30℃、24時間培養し、種培養液とした。次に同培地6Lを10L容ジャーファーメンターに移し、121℃、15分間オートクレーブ処理を行い、放冷後、種培養液60mlを移し、600rpm、通気2L/分、30℃で48時間培養した。培養液を遠心分離にて集菌し、50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。フレンチプレスで処理し、遠心分離を行い、上清液 (酵素液) を得た。得られた酵素液を硫酸分画、DEAE-セファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、セファデックスG-200によるゲルろ過により、比活性12U/mgにまで精製した。

【0030】実施例2 ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素の取得

ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素の活性測定は、以下の測定方法により行った。

〈試薬〉

50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、100mM ベタイン、20mM L-ホモシステイン、0.5mM 4-アミノアンチピリン、2mM フェノール、0.05%トリトンX-100、10U/ml ジメチルグリシンオキシダーゼ、5U/ml ペルオキシダーゼ (東洋紡績製)

【0031】〈測定条件〉上記測定混液3mlを37℃で約5分間予備加温後、0.1mlの酵素溶液を加え、緩やかに混和後、水を対照に37℃に制御された分光光度計で5分間記録し、その直線部分から1分間あたりの500nmにおける吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定する。上記条件で1分間に1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量を1単位 (U) とする。

【0032】ブタ肝臓を氷冷した0.1M NaClを含む50mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中でホモジナイズし、遠心分離、さらには超遠心分離を行い、上清液 (酵素液) を得た。得られた酵素液を硫酸分画、DEAE-セファロースクロマトグラフィーにより比活性0.1U/mgにまで精製した。

【0033】

実施例3 ホモシステイン標準試料の測定

ホモシステイン標準液 50μlを1U/ml ベタイ

ン-ホモシステインメチル転移酵素、10 U/ml ジメチルグリシンオキシダーゼ、5 U/ml ペルオキシダーゼ、40 mM ベタイン、0.5 mM 4-アミノアンチピリン、2 mM フェノール、0.05% トリトンX-100、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を含む溶液2.0 ml と混合し、10分間、37℃で反応させ、分光光度計で500 nmにおける吸光度を測定した。結果は図1に示す通りであって、ホモシステインの量が0～0.5 マイクロモルの範囲において優れた直線性を示し、定量が可能であった。

【0034】

【発明の効果】 上述したように、本発明のホモシステインの測定方法により、従来のようにクロマトグラフィーや抗原抗体反応を利用してホモシステインを定量する方法と比べて、ホモシステインの高感度な定量が可能になった。特に血清中のホモシステイン定量は心臓疾患の危険因子として注目を浴びており、本発明の高感度ホモシステイン測定方法は安価で簡便な方法として広く用いられることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明におけるホモシステインの測定方法の定量性を示す図である。

【図1】

